

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК
Кафедра экологии, физиологии и биологической эволюции

**Биоиндикация техногенно-трансформированных биотопов с
использованием *Drosophila melanogaster* (на примере г. Белгорода)**

Выпускная квалификационная работа бакалавра
очной формы обучения 4курса группы 07001214,
направление подготовки 06.03.01- Биология
Катенёвой Виктории Валентиновны

Научный руководитель
д.б.н, профессор
Батлуцкая Ирина Витальевна

БЕЛГОРОД 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	6
1.1. Биоиндикация.....	6
1.2. Мутации.....	9
1.2.1. Геном <i>Drosophila melanogaster</i>	9
1.2.2. Гены Y-хромосомы.....	11
1.2.3. Летальные гены.....	14
1.2.4. Условно-летальные мутации.....	15
1.2.5. Учёт летальных мутаций.....	16
1.2.6. Методы учета мутаций.....	17
1.2.7. Классификация мутаций.....	19
Глава 2. Материалы и методы.....	22
2.1. Материал.....	22
2.1.1. Общая характеристика <i>Drosophila melanogaster</i>	22
2.2.2. Жизненный цикл <i>Drosophila melanogaster</i>	23
2.2.3. Пробы воды.....	29
2.2. Методы.....	30
2.2.1. Сбор <i>Dr. melanogaster</i> диких популяций из природы.....	31
2.2.2. Сбор воды из водоемов.....	32
2.2.3. Приготовление питательной среды для разведения и культивирования <i>Dr. melanogaster</i>	32
2.2.4. Методика доминантных летальных мутаций у <i>Dr. melanogaster</i>	32
2.2.5. Анализ проб воды из водоемов.....	36
2.2.6. Статистическая обработка данных метода ДЛМ.....	38
3. Результат исследований.....	41
Заключение.....	54
Выводы.....	56
Список литературы.....	57

Приложение.....	62
-----------------	----

ВВЕДЕНИЕ

Метод генетического анализа на мутагенность с использованием дрозофилы и его применение для биологического контроля состояния осмов является актуальным направлением биомониторинга в связи с ухудшением состояния окружающей среды. Метод учета доминантных летальных мутаций *Dr. melanogaster* применяется для оценки влияния химических веществ на тест-организмы. Однако работ по применению данного метода к водной среде нами не обнаружено. Этим объясняется актуальность проведенных нашего исследования.

Из-за глобального распространения антропогенных мутагенов трудно говорить о естественном фоне мутагенного загрязнения. Особенную опасность вызывает локализация высокого уровня мутагенного загрязнения на урбанизированных территориях. В городах, с их своеобразными абиотическими условиями (меньше ветров, меньше влажность) и с большим количеством потенциальных источников загрязнения (промышленные предприятия, транспорт), складывается совершенно особая среда обитания.

В этом эксперименте я решила использовать *Dr. melanogaster*. Связано это с тем, что у *Dr. melanogaster* короткий цикл развития, высокая плодовитость и большое число изученных генов.

Цель: проведение биоиндикацию техногенно-трансформированных водных биотопов с использованием *Dr. melanogaster*

Задачи:

1. Провести сбор *Dr. melanogaster* диких популяций из чистых и загрязнённых участков.
2. Провести учет частоты доминантных летальных мутаций (ДЛМ).
3. Взять пробы воды из водоемов условно чистых и участков подверженных антропогенным воздействиям, взять пробы для проведения биомониторинга.

4. Выявить наиболее значительные биоиндикационные показатели изменчивости признаков *Dr. melanogaster*.

Объект исследования используется 2 линии *Dr. melanogaster*:

Dr. melanogaster лабораторная линия дикий тип D-32.

Dr. melanogaster из природных популяций.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Биоиндикация

Биоиндикация – это оценка состояния среды с помощью живых объектов. Живые объекты (или системы) – это клетки, организмы, популяции, сообщества. С их помощью может производиться оценка абиотических и биотических факторов.

Биоиндикация осуществляется на всех уровнях организации живого: биологических молекул, клеток, тканей и органов, организмов, популяций, сообществ, экосистем и биосферы в целом.

На низших уровнях биоиндикации возможны прямые и специфические формы, на высших – лишь косвенные и неспецифические.

Прямая биоиндикация - это когда фактор среды действует на биологический объект непосредственно

Косвенная биоиндикация - это фактор действует через изменение других (абиотических или биотических) факторов среды.

Последние дают комплексную оценку влияния на антропогенные воздействия на природу в целом.

Биоиндикаторы - это биологические объекты (от клеток и биологических макромолекул до экосистем и биосферы), используемые для оценки состояния среды.(Мелехова и др., 2007).

Критерии выбора биоиндикатора:

- быстрый ответ;
- надежность;
- простота;
- мониторинговые возможности (постоянно присутствующий в природе объект).

При проведении оценки качества окружающей среды применяются различные химические и физические методы, используется высокоточная

аппаратура, но особенно важной является биологическая оценка. Состояние живых организмов позволяет узнавать изменения в окружающей среде, которые могут привести к нарушению равновесия природных систем и к необратимым последствиям (Дружкина, 2007).

Факторы воздушной среды. Анализ воздушной среды позволяет проверять эффективность работы вентиляционных устройств в производственных помещениях. Если в воздухе обнаружены токсические вещества, концентрации которых превышают предельно допустимые, то газоспасатели сообщают об этом руководству предприятия, которое принимает меры, чтобы наладить нормальную работу вентиляции.

Содержание радиоактивных и токсических веществ в большинстве случаев складывается из двух операций: 1) отбора проб воздуха и 2) количественного определения искомого вещества в пробе.

Анализ воздушной среды позволяет проверять эффективность работы вентиляционных устройств. Если в воздухе обнаружены токсические вещества в концентрации, превышающей предельно допустимую норму, то сообщают об этом руководству предприятия, которое должны принять меры, чтобы наладить нормальную работу вентиляции. (Руденко, 1980).

Факторы почвенной среды. Для большинства наземных организмов, не столько важен климат района, сколько условия их непосредственного обитания.

Анализ почв может показать, какие элементы питания в растворимом состоянии находятся в почве. Имеется так же определенный запас нерастворимых веществ, сходный по составу с растворимыми. Так, если почва бедна растворимым фосфором, то, скорее всего, она бедна и нерастворимым фосфором (Дербенцева и др., 2005).

Факторы водной среды. Самой чистой природной водой считают дождевую, снеговую воду, но и она, падая на поверхность земли, увлекает за собой минеральные, органические и организованные примеси. Серьезную опасность для здоровья населения представляет химический состав воды,

который определяется условиями формирования водоёма, составом водоносных пород, количеством биогенных загрязнителей. Именно поэтому первоначальный анализ осуществлялся по органолептическим показателям (цвет, запах, прозрачность).

Анализ воды, а точнее лабораторные исследования проб воды, позволяет сделать выводы о качественном составе воды, пригодности ее для питья, возможности использования в хозяйственно-бытовых либо производственных целях. Перед тем, как начать использовать любую, даже самую чистую на вид воду, необходимо сделать ее анализ на предмет содержания в ней различных примесей, оказывающих неблагоприятное влияние на живой организм, применяемое бытовое либо производственное оборудование. В случае обнаружения в воде превышения предельно допустимых концентраций каких либо элементов, проведённый анализ воды позволит максимально точно подобрать необходимое водоочистное оборудование. Дело в том, что универсального фильтра для очистки воды от всех загрязнений просто не существует. Подавляющее большинство как бытовых, так и промышленных фильтров – это многоступенчатые системы, в которых каждое звено решает свой набор задач. Соответственно, для того чтобы определить, какие звенья необходимо включить в систему очистки, обязательно нужен анализ воды. Так же анализ воды важен в процессе эксплуатации фильтровальных систем для мониторинга качества воды после системы очистки и контроля колебаний состава исходной воды.

Место для отбора проб воды необходимо выбирать в зависимости от источника воды и целей анализа. Из открытого водоема пробу отбирают на той глубине и в том месте, которые намечены для забора воды. (Балаян и др., 2015).

1.2. Мутации

Мутация — стойкое преобразование генотипа, происходящее под влиянием внешней или внутренней среды. Мутации делятся на спонтанные и индуцированные.

Спонтанные мутации возникают самопроизвольно на протяжении всей жизни организма в нормальных для него условиях окружающей среды с частотой.

Индуцированными мутациями называют наследуемые изменения генома, возникающие в результате тех или иных мутагенных воздействий в искусственных (экспериментальных) условиях или при неблагоприятных воздействиях окружающей среды.

Мутации появляются постоянно в ходе процессов, происходящих в живой клетке. Основные процессы, приводящие к возникновению мутаций — репликация ДНК, нарушения репарации ДНК, транскрипции и генетическая рекомбинация.

Мутагенез — внесение изменений в нуклеотидную последовательность ДНК (мутаций). Различают естественный (спонтанный) и искусственный (индуцированный) мутагенез. (Захаров и др., 1993).

1.2.1. Геном *Drosophila melanogaster*

Геном — совокупность наследственного материала, заключенного в клетке организма. Геном содержит биологическую информацию, необходимую для построения и поддержания организма. Большинство геномов построены из ДНК, однако некоторые вирусы имеют геномы из РНК.

Геном *Dr. melanogaster* содержит 4 пары хромосом: X/Y пара и три аутосомы, маркируемых как 2, 3 и 4. Четвёртая хромосома точковидная; X

(или первая), 2 и 3-я хромосомы — метацентрические. Геном состоит из порядка 132 миллионов оснований и приблизительно 13 767 генов.

Гены всех живых организмов кодируют информацию для синтеза белковых молекул, из которых создаются все компоненты клеток и которые катализируют биохимические процессы. В действительности каждую биохимическую функцию или элемент морфологии тела у *Dr. melanogaster* удалось связать с действием того или иного гена. Так как долгое время не утихали споры о том, контролируется ли поведенческие и психические функции, такие, как мотивация поступков, приверженность привычкам, расположенность к определенной сфере деятельности или психическим болезням, способность к обучению, половое поведение генами или они развиваются в результате влияния окружающей среды ученые занимались исследованием этой области и выявили возможность изучить генетику поведения на модельном объекте дрозофилы, лучше всего были изучены гены, контролирующие простые функции такие как: зрение, обоняние, брачное поведение, способность к обучению. (Сингер и др., 1998).

Существуют подвижные фрагменты генома клетки, способные к самостоятельным перемещениям внутри генома, этот геном называется мобильный генетический элемент (МГЭ). Они подвижны в геноме хозяина и содержат внутри себя гены, которые обеспечивают транспозицию. Построение генетических карт, изначально казалось, что положение генов на карте стабильное и устойчиво наследуется. Только это относится к части генома, действительно преобладающей и стабильной, но не исчерпывающей его строения. Большая часть генома представлена различными МГЭ, среди которых многие копии способны к относительно частым перемещениям, что значительно выше возникновения мутаций и перестроек.

По этой причине генетический материал генома пришлось разделить на две сопоставимые части: устойчивую и подвижную

1) устойчивая — это совокупность устойчивых генов и других элементов генома.

2) подвижная – совокупность копий МГЭ генома, способных к перемещениям (мутациями генов, перестройками и т.д.).

МГЭ были открыты американским генетиком Барбарой Мак-Клинтон на кукурузе в 1951 году, а в 1983 году это открытие было удостоено Нобелевской премии. В 60-х годах МГЭ были открыты также у микроорганизмов, были выявлены их некоторые молекулярные особенности и механизмы транспозиций (перемещений внутри генома). В конце 70-х годов одновременно в СССР (группой советских генетиков во главе с Г.П. Георгиевым) и США (группой американских генетиков во главе с Д. Хогнессом) были открыты МГЭ у *Dr. melanogaster*. Различные МГЭ были найдены также у дрожжей, млекопитающих, включая человека, и других объектов.

Цитологический анализ выявляет наиболее заметное различие у полов – сочетание половых хромосом в кариотипе, причем один пол имеет одинаковые хромосомы, а в кариотипе другого пола две разные половые хромосомы. (Васильева, 2000).

1.2.2. Гены Y-хромосомы

В 1916 году, американский ученый К. Бриджес установил, что экспериментально полученные самцы дрозофилы без Y-хромосомы (то есть XO в отличие от нормальных самцов XY) имеют нормальную жизнеспособность и строение всех органов, но они полностью стерильны. В последующих экспериментах было показано, что Y-хромосома дрозофилы содержит только девять генов, из которых шесть влияют на способность самцов оставлять потомство (фертильность). Оставшиеся три гена – это *bobbed* (bb), серия или кластер генов, кодирующих рибосомную РНК и активность которых приводит к образованию ядрышка. Ген bb, состоящий из повторенных фрагментов, занимает около 5% всей ДНК Y-хромосомы.

В пределах гена *bb* находятся участки, контролирующие процесс конъюгации хромосом в мейозе. В мейозе спариваются гомологичные хромосомы за счет конъюгации гомологичных последовательностей нуклеотидов ДНК. Поскольку половые X- и Y-хромосомы морфологически и функционально совершенно различны, вопрос о механизмах спаривания этих элементов в мейотической профазе I достаточно актуален.

В 1990 году стало известно, что ответственными за опознание X- и Y-хромосом и их последующую конъюгацию и расхождение в мейозе являются короткие последовательности нуклеотидов, расположенные в промежутках между генами рибосомной РНК, как в X-, так и Y-хромосоме.

Ген – *crystal* так же влияет на поведение хромосом в мейозе и правильное формирование гамет. Разрывы участка хромосом, занимаемого этим геном, не приводят к развитию каких-либо фенотипических изменений у самцов дрозофил. При полном или частичном удалении этого участка с помощью делеций в первичных сперматоцитах, в клетках, из которых образуются сперматозоиды, появляются белковые кристаллы, а во время мейоза нарушается расщепление хромосом. Существует еще один ген, расположенный в эухроматине X-хромосомы, – *Stellate* (*Ste*), который взаимодействует с геном *crystal*.

Если в X-хромосоме присутствует нормальный аллель гена *Stellate* (*Ste*⁺), кристаллы имеют игловидную форму, если мутантный *Ste*[–] – они приобретают вид звезды. Ген *Ste*⁺ был клонирован, и в результате анализа ДНК было показано, что он содержит тандемно повторенную последовательность длиной 1250 п.н. Высокая степень повторенности приводит к образованию звездовидных кристаллов у *Ste*[–] /0.

У *Dr. melanogaster* было найдено шесть факторов фертильности самцов (*kl-5*, *kl-3*, *kl-2*, *kl-1*, *ks-1* и *ks-2*). Из них три очень больших: *kl-5*, *kl-3* и *ks-1* – занимают по 10% Y-хромосом каждый, то есть примерно по 4000 т.п.н.

Три немецких ученых (G.F.Meyer, O. Hess, W. Beermann), в 1961 году описали особые нитевидные структуры в ядрах развивающихся

сперматоцитов *Dr. melanogaster*, которые впоследствии стали называть петлями. Такие структуры были найдены фактически у всех 50 изучаемых видов дрозофилы. Показано, что петли – это декомпактизованные, а следовательно, активные участки Y-хромосом. В петлях синтезируется РНК и накапливаются белки. Каждая петля в ядре данного вида дрозофилы имеет характерные размеры, ультраструктуру и внешний вид. У каждого вида морфология набора петель другая. (Вайсман и др., 1995).

Факты, которые свидетельствуют о том, что петли формируются из материала Y-хромосомы.

1. У самцов, не имеющих Y-хромосомы (ХО), нет и петель, а у особей с двумя Y-хромосомами (ХYY) они присутствуют в двойном наборе. Если происходит делеция части Y-хромосомы, обнаруживаются не все петли. В линиях с дупликациями частей Y-хромосомы число петель соответственно увеличивается.

2. У межвидовых гибридов морфология петель такая же, как и у вида – донора Y-хромосомы.

Было доказано, что гены фертильности самцов локализованы в петлях.

1. Сначала были установлены корреляции между числом генов и петель. Затем, используя хромосомные перестройки, установили прямое соответствие в их локализации. Так, фактор *kl-5* соответствует петле А, поскольку и петля, и фактор располагаются между точками разрывов одних и тех же перестроек (рис. 1). Фактор *kl-3* расположен в петле В, *ks-1* – в петле С.

2. При удалении делециями хотя бы одной петли самец становится стерильным.

Одним из свидетельств генетической активности петель является синтез в них РНК. В петлях синтезируется до 50% внеядрышковой РНК.

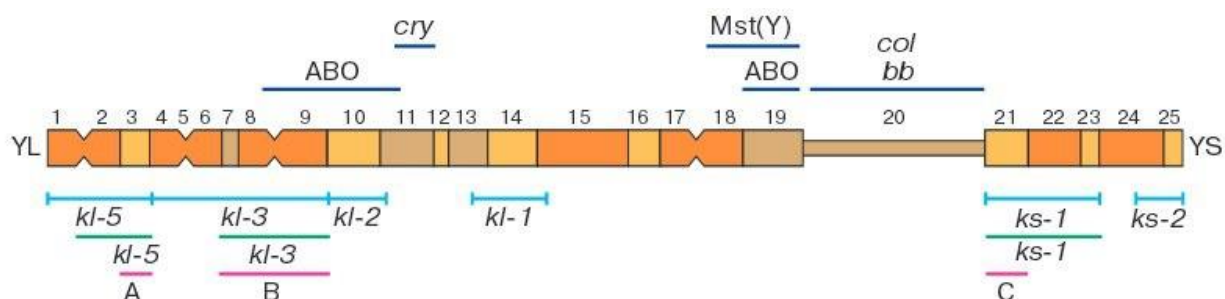


Рис. 1. Цитологическая карта различных фрагментов гетерохроматина.

Обозначения: Y-хромосомы дрозофилы. 1–25 – номера фрагментов гетерохроматина. Центромера находится между номерами 17 и 18, поэтому номера с 1 по 17 относятся к длинному плечу (YL), а с 18 по 25 – к факторам плодовитости самцов, A–C – участки, из которых образуются петли в сперматоцитах короткому плечу (YS). Горизонтальные линии над картой с надписями представляют собой локализацию на данной карте генов, выявленных в Y-хромосоме. Ниже цитологической карты (kl-5 и др.) нанесена локализация

В петлях накапливается большое количество различных белков, которые составляют основную часть белков в ядрах сперматоцитов. Часть белков входит в состав РНП-частиц, заполняющих пространство вокруг петель. Некоторые белки являются специфическими для определенных петель. Белки, накапливаемые в петлях Y-хромосомы, кодируются генами из других хромосом. (Жимулев, 2000).

1.2.3. Летальные гены

Летальные гены – это ген вызывающие смертельный исход в гомозиготном состоянии. Наряду с ними известно большое число полулетальных факторов, приводящих очень часто к рождению различного рода нежизнеспособных уродов или просто тем или иным способом отражающихся на жизнеспособности организмов.

Летальные и сублетальные мутации характеризуют одомашненные формы животных, так как в диком состоянии энергичная борьба за существование уничтожает все организмы, обладающие мутациями, которые

вызывают те или иные дегенеративные признаки. Когда один ген может оказывать влияние на несколько признаков, в том числе и на жизнеспособность. Летальные мутации вызывают такие изменения в развитии, которые несовместимы с жизнедеятельностью. Доминантные летальные гены трудны для изучения, и сведения о них ограничены. Гены с рецессивным летальным действием изучены гораздо лучше. Существует множество рецессивных мутаций у различных организмов, которые никак себя не проявляют фенотипически. Существует также очень много доминантных мутаций, имеющих в гетерозиготном состоянии четко отличающийся фенотип, которые в гомозиготном состоянии вызывают летальный эффект. Фаза летального действия, то есть время, когда мутантный ген реализуется, существенно варьирует: от самых первых этапов эмбрионального развития до периода полового созревания. В некоторых случаях летальные гены могут иметь более одной фазы летального действия. Это означает, что ген или его продукты могут иметь несколько раз активно работать и использоваться в ходе онтогенеза. Летальный эффект одних мутантных генов проявляется всегда, другие показывают существенную зависимость от условий среды. (Юрченко и др., 1995).

1.2.4. Условно-летальные мутации

Условно-летальные мутации фенотипически проявляются утратой способности вируса размножаться при непермиссивных условиях. Такая мутация может происходить в любом гене, кодирующем как структурные, так и неструктурные белки. Поэтому в каждом случае утрачивается способность функционировать в непермиссивных условиях определенного белка. Поскольку продукты всех генов гаплоидного генома вирусов являются жизненно важными, потеря способности функции одного из них сказывается на размножении вируса в целом. Условность этих мутаций заключается в

том, что в перmissive условиях продукт мутантного гена функционирует нормально.

Из условно-летальных мутантов вирусов наиболее популярны температурочувствительные (гэ), хозяинзависимые и устойчивые к различным лекарствам.

Много получено и изучено мутантов, методы выделения которых хорошо разработаны и могут использоваться в отношении, всех групп вирусов. Правда, обзор сведений по выделению мутантов обращает внимание на применение довольно узкого круга штаммов и мутагенных факторов (5-ФУ, нитрозогуанидин, гидроксилламин, азотистая кислота, УФ-лучи), случайность выбора их доз и способов воздействия на вирусы. (Ючрченко и др., 1995).

1.2.5 Учёт летальных мутаций

Методы генетического анализа основаны на скрещивании возможных носителей мутации с тестерными линиями (линиями-анализаторами). Самый простой метод – это скрещивание носителей предполагаемой мутации с соответствующей рецессивно-гомозиготной линией, то есть обычное анализирующее скрещивание.

Этот метод не позволяет выявить неизвестные мутации, а также летальные мутации. Поэтому создаются специальные тестерные линии для учета летальных мутаций.

Для выявления мутаций используются самцы дикого типа – с нормальными X-хромосомами (аллели V^+ и w^+ – нормальные красные глаза, sc^+ – нормальные щетинки; нормальный порядок генов). Эти самцы подвергаются обработке мутагенами (факторами, повышающими частоту мутаций). В результате в их половых клетках часть X-хромосом мутирует, то есть в них возникают мутации. Обработанные самцы скрещиваются с лабораторными самками. (Орлова, 1991).

1.2.6. Методы учета мутаций

Учет количества возникающих мутаций необходим при исследовании природы гена, его изменения, для понимания механизма влияния внешних условий и физиологического состояния организма на мутационный процесс.

Трудность подобного учета заключается в том, что часто не удается отличить мутацию от рекомбинации. В результате процессов расщепления и кроссинговера, в потомстве могут появляться новые наследственные признаки, которые легко принять за мутации. Такое же явление возможно при взаимодействии генов; рекомбинации могут имитировать мутации особенно в тех случаях, когда гены тесно сцеплены и редко разделяются в результате кроссинговера.

Методы обнаружения мутаций должны быть разными в зависимости от особенностей объекта — главным образом способа размножения организма. При вегетативном и бесполом размножении многоклеточных организмов мутации учитываются в соматических тканях, дающих побег, в потомстве одной особи (по клонам). У самооплодотворяющихся растений и животных рецессивные мутации проявляются в следующем же после возникновения мутации поколении перекрестно оплодотворяющихся организмов возникающие мутации переходят в гетерозиготное состояние в популяции особей, для выявления их необходимо применять близкородственное скрещивание (инбридинг), чтобы увеличить вероятность встречи особей, несущих в себе мутировавший ген. (Вайсман и др., 1995).

Подсчет мутаций в отдельных локусах и определенного типа мутаций вполне доступен. Некоторые видимые морфологические изменения можно учитывать довольно точно; несколько более сложным является определение физиологических и биохимических изменений у многоклеточных организмов.

Легче всего обнаруживаются видимые доминантные мутации, которые могут проявляться в гетерозиготном состоянии в первом же поколении, труднее анализировать рецессивные мутации. Для выявления последних требуется специальный генетический анализ в ряду поколений. Для того чтобы учитывать мутации, особенно рецессивные, возникшие как единичные изменения в хромосомах половых клеток, их необходимо переводить в гомозиготное состояние. Для дальнейшего анализа мутантную линию скрещивают с линией-анализатором, имеющей одну или несколько маркированных групп сцепления. Такой подход позволяет не только подтвердить ее наследование, но и сберечь время на анализ принадлежности мутации к соответствующей группе сцепления.

Для хорошо изученных в генетическом отношении объектов (дрозофила, кукуруза, ряд микроорганизмов) с установленными группами сцепления изучение новой мутации проводить довольно легко, действуя только что указанным путем. Для этих же объектов разработаны специальные методики учета частоты мутаций, возникающих в отдельных хромосомах. Для обнаружения видимых мутаций в половой хромосоме у дрозофилы используется методика сцепленных X-хромосом — уу (двойной желтый).

Наиболее объективно можно учитывать рецессивные летальные мутации, приводящие в гомозиготном состоянии к смерти несущих их особей. Для учета таких мутаций в половой хромосоме дрозофил, Г. Мёллером была разработана методика CIB. (Юрченко и др., 1995).

Генетическая структура линии CIB характеризуется тем, что одна из X-хромосом самки маркирована доминантным геном Bar (полосковидные глаза). В этой же хромосоме имеется инверсия, обозначаемая буквой C. Эта инверсия препятствует кроссинговеру и обладает рецессивным летальным эффектом 1, то есть зиготы, несущие две такие X-хромосомы, погибают. Этими тремя начальными буквами (CIB) и обозначена линия-анализатор на летальные мутации в половых хромосомах дрозофилы.

Если в одном из спермиев анализируемого самца в X-хромосоме возникает летальная мутация, то при оплодотворении таким спермием яйцеклетки с X-CIB-хромосомой развивается гетерозиготная по данной летали самка. В F1 будут встречаться самки двух типов: с нормальными (круглыми) и с полосковидными глазами (Bar). Каждая из этих самок несет по одной X-хромосоме отца. Самцы, несущие хромосому CIB, не развиваются, так как у них деталь находится в гемизиготном состоянии. Поэтому самцы в F1 встречаются только с нормальными глазами. Для дальнейшего анализа самок F1 с геном Bar скрещивают индивидуально с нормальными самцами (каждая пара в отдельной пробирке).

Если самка F1 получила X-хромосому анализируемого самца с летальной мутацией и, следовательно, стала гетерозиготной по ней, то в потомстве F2 такой самки не появится самцов, так как все они погибнут. В результате расщепление по полу в такой культуре оказывается в отношении $2♀:0♂$ (при чем половина самок с нормальными глазами, а половина — сполосковидными). Число исследуемых на обнаружение летальных мутаций самок CIB из F1-дочерей одного исходного анализируемого самца будет соответствовать числу исследованных X-хромосом в его сперматозоидах.

Эта методика и очень удобна для количественного учета возникающих летальных мутаций, но у самок F1 между половыми хромосомами иногда может происходить двойной перекрест, это может привести к снижению истинной частоты летальных мутаций.

Летальные мутации по генетической природе являются смешанным типом мутаций, к которым относятся как различного рода хромосомные перестройки, так и изменения отдельных генов. (Орлова, 1991).

1.2.7. Классификация мутаций.

1. Классификация мутаций по характеру воздействия на генотип:

1.1. Генные мутации или точечные

- 1.2. Изменения хромосом или хромосомные перестройки
- 1.3. Изменения числа наборов хромосом.
2. По характеру изменения фенотипа:
 - 2.1. Морфологические
 - 2.2. Физиологические
 - 2.3. Биохимические
3. По проявлению в гетерозиготе:
 - 3.1. Рecessивные
 - 3.2. Доминантные
4. В зависимости от причин, вызывающих мутации:
 - 4.1. Спонтанные – мутации, причина возникновения которых неизвестна.
 - 4.2. Индуцированные – мутации, возникшие в результате какого-либо воздействия.
5. По степени отклонения от нормального фенотипа (Г. Меллер):
 - 5.1. Гипоморфные
 - 5.2. Аморфные
 - 5.3. Антиморфные
 - 5.4. Неоморфные
 - 5.5. Гиперморфные
6. По локализации в клетке:
 - 6.1. Ядерные
 - 6.2. Цитоплазматические (мутации внеядерных генов)
7. По возможности наследования:
 - 7.1. Генеративные
 - 7.2. Соматические
8. По адаптивному значению:
 - 8.1. Полезные
 - 8.2. Нейтральные
 - 8.3. Вредные (летальные и полуметальные)

9. По отклонению от нормы или дикого типа:

9.1. Прямые – мутации от состояния дикого типа к новому состоянию. Возможно связаны с потерей гена.

9.2. Обратные - мутации, от мутантного состояния к дикому. Свидетельствуют о том, что при прямом мутировании ген не потерян, а произошло лишь изменение гена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Самцы линии D-32 скрещены с самками собранные из природы.

Наибольшее количество яиц отложенных самками взятых из природы насчитывается в контроле (620 яйца), наименьшее количество в опыте с минеральной водой (443 яйца) и в опыте с водой, взятой из реки Северный донец (п. Беломестное) Глинка (456 яиц).

Наибольшее процент ДЛМ в опыте с минеральной водой (17,27%) и в опыте с водой, взятой с реки Северский донец, Авторынок (8,37%).

Для всех проб не обнаружено значимых различий по сравнению с контролем ($p \leq 0.05$). Сравнивая пробы между собой, мы не обнаружили также значимых различий. ($p \leq 0.01$).

По критерию Стьюдента, опыт с контрольной средой достоверна.

По эксперименту видно, что опыт с минеральной водой и опыт с водой, взятой с реки Северский Донец, Авторынок патогенно влияет на *D. melanogaster*.

Самцы, собранные из природы скрещены с самками линии D-32.

Наибольшее количество яиц отложено самками линии D-32 с контрольной средой (680 яиц). Наименьшее число яиц в опыте с минеральной водой (361 яиц) и в опыте с водой, взятой из реки Северный донец (п. Беломестное) Глинка (4436 яиц).

Наибольшее процент ДЛМ в опыте с минеральной водой (19,33%) , в опыте с водой, взятой с реки Северский донец, Авторынок (11,57%) и в опыте с водой, взятой с реки Северный донец (п. Беломестное) Плѣс (10,93%).

Для всех проб не обнаружено значимых различий по сравнению с контролем ($p \leq 0.05$). Сравнивая пробы между собой, мы не обнаружили также значимых различий. ($p \leq 0.01$).

По критерию Стьюдента, опыт с минеральной водой и опыт с водой, взятой с реки Северский Донец, поселок Беломестное, Плѣс достоверна.

По эксперименту видно, что опыт с минеральной водой, опыт с водой, взятой с реки Северский Донец, Авторынок и опыт с водой, взятой с реки Северский Донец, поселок Беломестное, Глинка патогенно влияет на *D. melanogaster*.

Входе эксперимента были так же обнаружены мертвые предкуколки (рис. 6 Приложение 5).

Анализ пробы воды из водоемов

Результаты исследования указывают на то, что сильного загрязнения природных вод на обследуемой территории не обнаружено. Посторонний запах может говорить о присутствии в воде органики, которая вызывает падение концентрации растворенного в воде кислорода, что может неблагоприятно отразиться на ряде процессов самоочищения водоёмов.

По водородному показателю среды по ГОСТу соответствуют все пробы. Содержание хлоридов и сульфатов в воде изучаемых объектов в пробирках обусловлено исключительно составом местных пород и жизнедеятельностью организмов.

ВЫВОДЫ

1. Был проведен сбор *D. melanogaster* диких популяций из чистых и загрязнённых участков (рис. 1 Приложение 1, рис. 2 Приложение 5).
2. Был проведен учет частоты ДЛМ.
3. Были взяты пробы воды из водоемов условно чистых и участков подверженных антропогенным воздействиям, были взяты пробы для проведения биомониторинга.
4. Были выявлены наиболее значительные биоиндикационные показатели изменчивости признаков *D. melanogaster*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биология. Книга 1 / Под ред. акад. РАМН В. Н. Ярыгина. М.: Высшая школа, 2003. 162с.
2. Брэм А.Э. Жизнь животных: В 3 т. Т.3: Пресмыкающиеся. Земноводные. Рыбы. Беспозвоночные. М.: ТЕРРА, 1992. 50-145 с.
3. Бродский А.К. Механика полёта насекомых и эволюция крылового аппарата. Л.: Наука. 1988. 132 с.
4. Боготова З.И., Биттуева М.М., Керефова М.К. Генетический анализ на *Drosophila melanogaster*: Методические указания к практическим занятиям по большому практикуму. Нальчик: Каб. -Балк. ун-т, 2009. 54 с
5. Батлущая И.В., Хорольская Е.Н., Глотов В.А. Практикум по общей, физиологической и экологической генетике: учеб.-метод. пособие Белгород: БелГУ, 2009 144с.
6. Балаян А. Э., Саксонов М. Н., Стом Д. И., Стом А. Д. Способ определяя токсичности водной среды.
7. Вайсман Н.Я., Захаров И.К. Взаимодействие генов *Mos* и *mwh*, проявляющих свое действие в соматических клетках *Drosophilamelanogaster* // Генетика. 1995а. Т. 31. № 3. С. 358-362.
8. Второва М.А. Насекомые в биологических исследованиях. IV Международная студенческая электронная научная конференция «Студенческий научный форум», Волгоград, Россия, 2012 3с.
9. Васильева Л.А. Индукция транспозиций мобильных генетических элементов стрессовыми воздействиями // Соросовский образовательный журнал, 2000, №6, с. 14-20.
10. Вайсман Н.Я., Захаров И.К. Генетический анализ мутантных хромосом 3 со сходным спектром фенотипического действия из географически удаленных популяций *Drosophilamelanogaster* // Генетика. 1995б. Т. 31. № 7. С. 932-938.

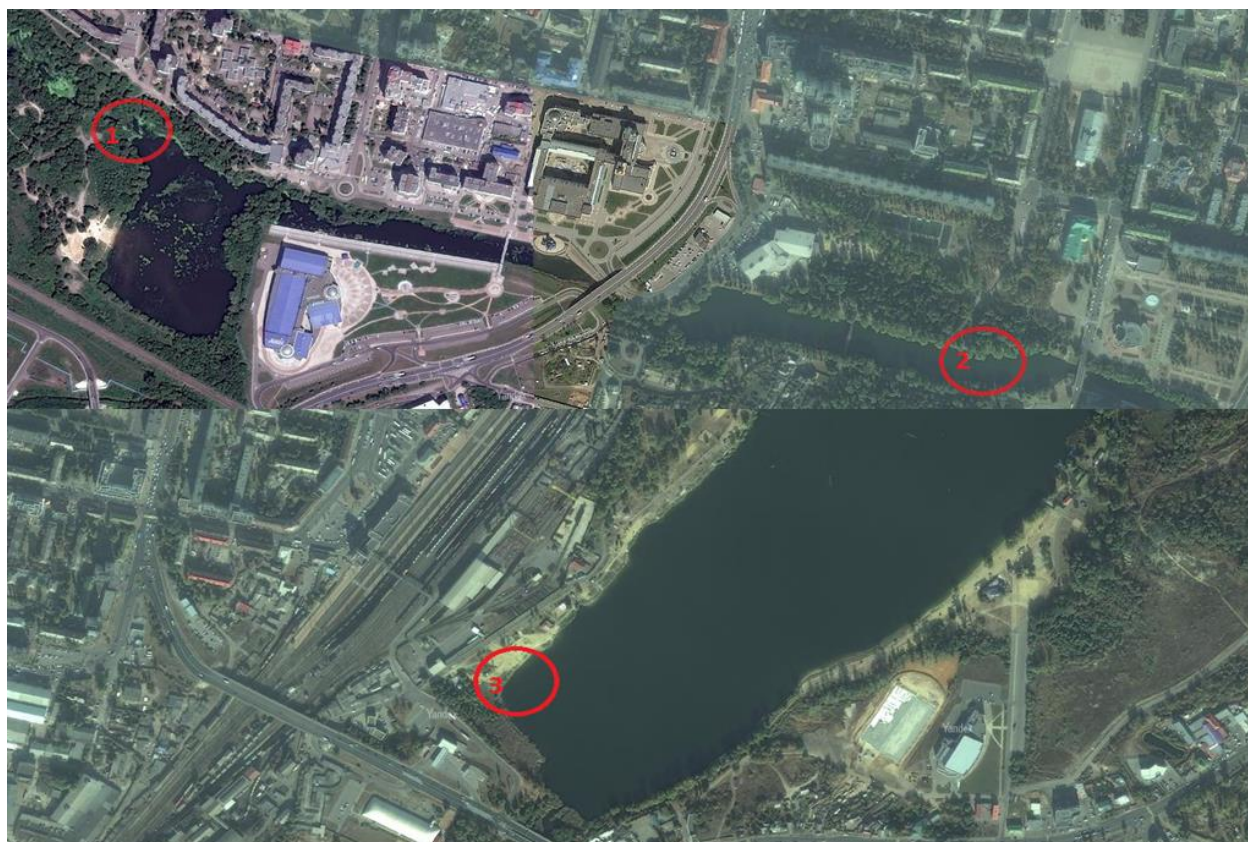
11. Гуттман Бартон, Энтони Гриффитс, Дэвид Сузуки, Тара Куллис. Генетика. М.: ФАИР-ПРЕСС, 2004. 448 с.
12. Гуляев Г. В. Генетика. Москва. «Колос», 1984 351с.
13. Грин Н. и др. Биология. М.: Мир, 1990. Т. 1-3.
14. Гершензон С.М. Мутации. Киев, Наукова Думка I-III, 1991. 111, [1] с.
15. Жимулев И.Ф. Трансформация у дрозофилы новый экспериментальный подход в генетике // Соросовский образовательный журнал, 2000, №7, с. 11-16.
16. Жимулев И.Ф. Молекулярная и генетическая организация гетерохроматина в хромосомах дрозофилы // Соросовский образовательный журнал, 2000, №2, с. 76-82.
17. Жимулев И.Ф. Как гены контролируют развитие пола у дрозофилы // Соросовский образовательный журнал, 1997, №12, с. 17-22.
18. Жимулев И.Ф. Действие генов в раннем развитии дрозофилы // Соросовский образовательный журнал, 1998, №7, с. 30-34.
19. Жимулев И. Ф. Общая и молекулярная генетика. Новосибирск: Изд-во НГУ, 2003.
20. Жимулев И.Ф. Молекулярная и генетическая организация гетерохроматина в хромосомах дрозофилы. Биология №14 1996.
21. Захаров И.К., Баласов М.П., Беляева Е.С. и др. Мутации и мутагенез в популяциях *Drosophilamelanogaster* Алтая. Оценка мутагенности продуктов питания // В кн.: Генетические эффекты антропогенных факторов среды / Новосибирск. ИЦиГ СО РАН. 1993. С. 44-61.
22. Иванников А.В., Захаров И.К. Пониженная MR-активность среди хромосом с летальной мутацией в природной популяции *Drosophilamelanogaster* // Доклады Академии наук. 1992. Т. 324. № 2 . С. 436-438.

23. Иванников А.В., Голубовский М.Д., Коромыслов Ю.А., Захаров И.К. MR-хромосомы в Евразийских популяциях *Drosophilamelanogaster* // Генетика. 1995. Т. 31. № 2. С. 209-211.
24. Клаг У., Каммингс М. Основы генетики. М.: Мир, 2007.
25. Кунин Е. В. Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции/Пер. с англ. The Logics of Chance. The Nature and Origin of Biological Evolution. М: ЗАО Издательство Центрполиграф, 2014. 527 с.
26. Ляшенко О. А. Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды. Санкт- Петербург: Издательство СПбГТУРП, 2012. 67 с.
27. Мюнтцинг. А. Генетика, общая и прикладная. Москва, Мир, стр. 1-610, 1967.
28. Мелехова О.П., Сарапульцева Е.И., Евсеева Т.И. и др. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. 3-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2007 288с.
29. Мелашенко Е. С. Содержание лабораторных линий *Drosophila Melanogaster*. Журнал «Инновации в науке». Выпуск № 1 (38) / 2015
30. Медведев Н. Н. Практическая генетика. Издательство «Наука». Москва 1968 – 294с.
31. Нехаева. В.И. Практический курс общей генетики. Учебное пособие для студентов биологических специальностей педагогических высших учебных заведений 2-е изд., стереотип. М.: ФЛИНТА, 2011 – 210с.
32. Орлова Н. Н. Генетический анализ. 1991
33. Прохорова И.М. Система тестов для оценки генотоксической активности факторов среды : статья. Ярославль, 2001.
34. Руденко Б.А. Хроматография с парообразными подвижными фазами. Сборник: Итоги науки и техники. Т. 3. Хроматография. М.: ВИНТИ, 1980. 236 с.
35. Соросовский Образовательный Журнал том 6 №2 2000.

36. Слюсарев. А.А. Биология с общей генетикой. Издательство «Медицина» Москва 1970, 487с.
37. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. Т. 2. Москва: Издательство «Мир», 1998. – 391с.
38. Серов О.Л. Генетика развития. Курс лекций для студентов 3 курса ФЕН НГУ. Новосибирск: Новосибирский государственный университет, 1998. С. 4-15.
39. Стриганова Б. Р., Захаров А. А. Пятиязычный словарь названий животных: Насекомые (латинский-русский-английский-немецкий-французский) / Под ред. д-ра биол. наук, проф. Б. Р. Стригановой. М.: РУССО, 2000.
40. Учебно-полевая практика и лабораторные работы, методическое пособие/Дербенцева А.М., Пилипушка В. Н. Владивосток, 2005. 24с.
41. Юрченко Н.Н., Коряков Д.Е., Захаров И.К. Возникновение рецессивных летальных мутаций в производных от нестабильной X7- хромосомы *Drosophilamelanogaster* // Генетика ЛШ. Т. 31. № 9. С. 1218-1224.
42. Юрченко Н.Н., Захаров И.К. Мутабельная X⁺-хромосома, выделенная из природной популяции *Drosophilamelanogaster* // Генетика. 1995. Т. 31. № 3. С. 422-426.
43. Borgaonker D. S. Chromosome Variation in Man: A Catalogue of Chromosomal Variants and Anomalies. 5th edn. New York: Alan R. Liss, 1989.
44. Gersh M. et al. Evidence for a distinct region causing a cat-like cry in patients with 5p delations // Am. J. Hum. Genet. 1995. Vol. 56. P. 1404—1410.
45. Kaiser P. Pericentric inversions: problems and significance for clinical genetics // Hum. Genet. 1984. Vol. 68. P. 1—47.
46. Lynch M., Conery J. S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes // Science. 2000. Vol. 290. P. 1151—1154.
47. Lipski J. R., Roth J. R., Weinstock G. M. Chromosomal duplications in bacteria, fruit flies, and humans // Am. J. Hum. Genet. 1996. Vol. 58. P. 21—26.

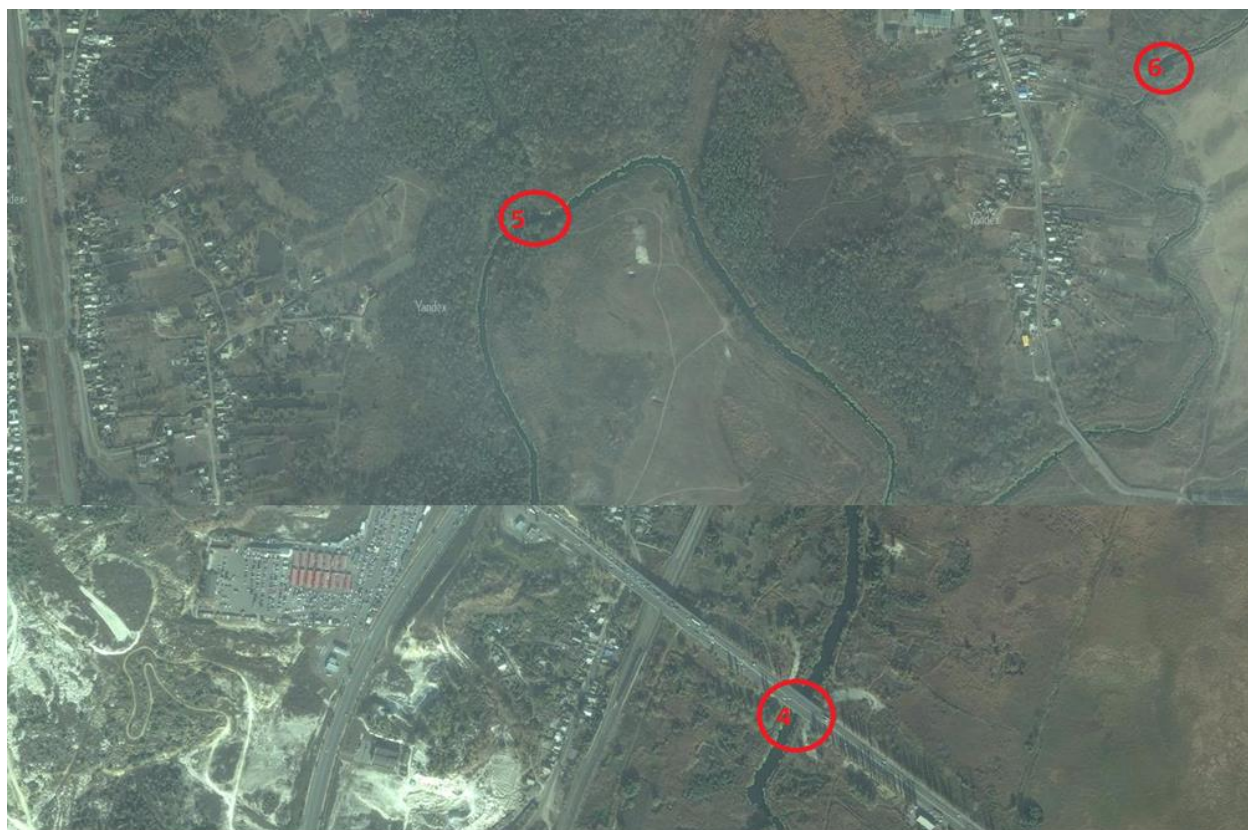
48. Mary L. Alexander, Janet Bergendahl Genetics - Dose rate effect in the developing germ cells of male *Drosophila*. 1963. Vol. 49. P. 1-16.
49. Madan K. Paracentric inversions: a review // Hum. Genet. 1995. Vol. 96. P. 503—515.
50. Ohno S. Evolution by gene duplication. New York: Springer-Verlag, 1970.
51. Page S. L., Shaffer L. G. NonhomologousRobertsonian translocations form predominantly during female meiosis // Nature Genetics. 1997. Vol. 15. P. 231—232.
52. Werner SchmidЖурнал Genetics The Effect of Carbon Monoxide as a Respiratory Inhibitor on the Production of Dominant Lethal Mutations by X-Rays in *Drosophila*. 1961. P. C. 663-670.

ПРИЛОЖЕНИЕ



1 – р. Везелка, ул. Левобережная; 2 – р. Везелка, Парк Победы; 3 – р. Северский Донец, ЖД вокзал, Городской пляж

Рис 1. Место сбора *D. melanogaster* и воды



4 – р. Северский Донец, Авторынок; 5 – р. Северский Донец, п. Беломестное, Плѣс;
6 – р. Северский Донец, п. Беломестное, Глинка



Рис. 2. Место сбора *D. melanogaster* и воды

Приложение 3

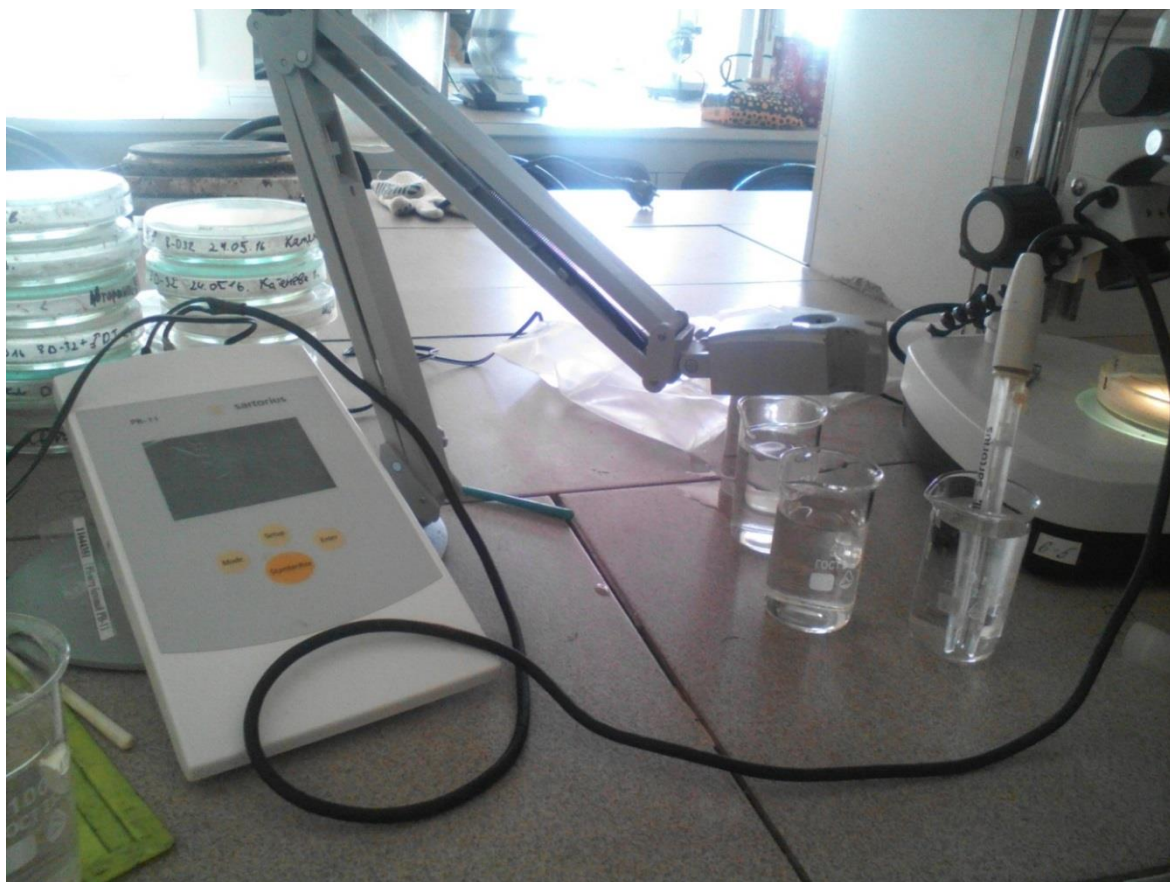


Рисунок 3. Электронный pH метр

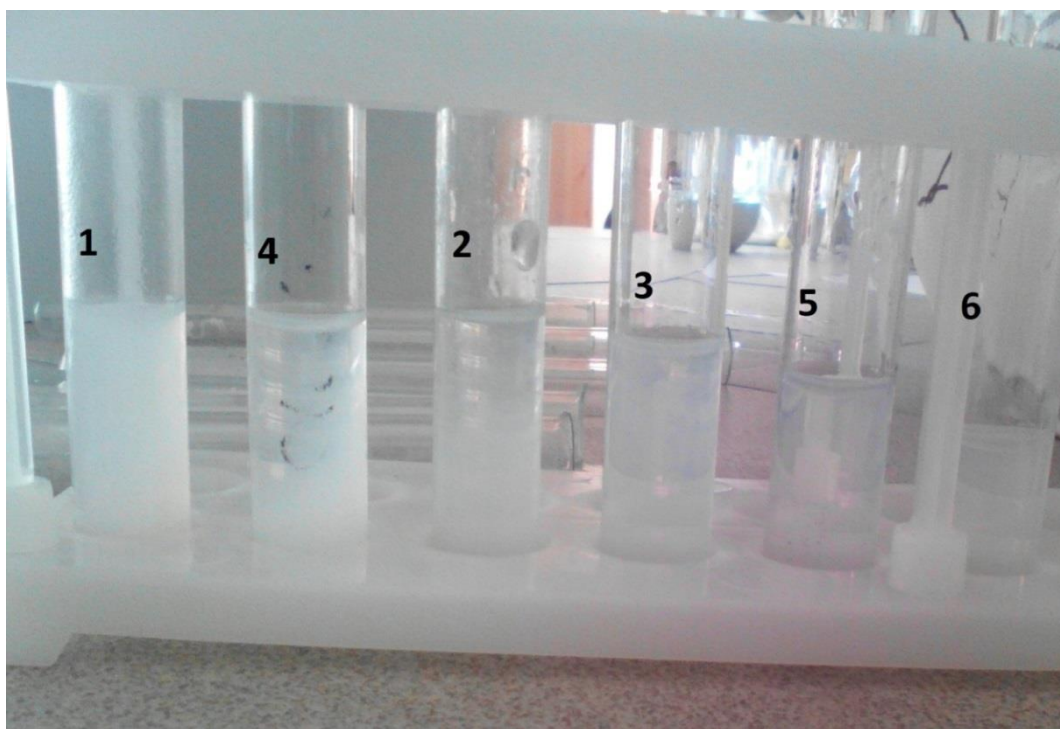


Рисунок 4. Определение содержания хлорид-ионов

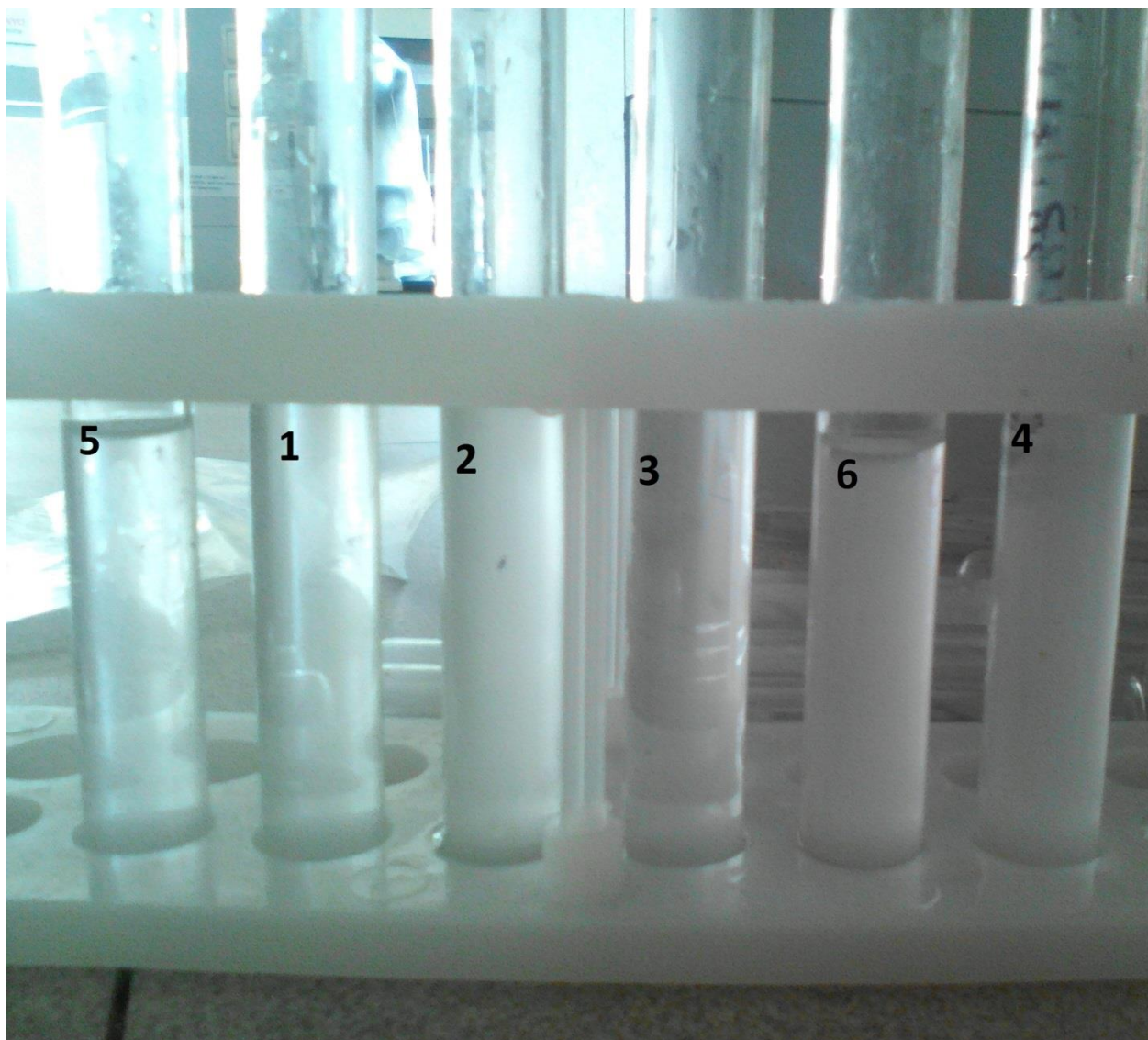


Рисунок 5. Определение содержания сульфат-ионов



Рисунок 6. Мертвая предкуколка *Drosophila melanogaster*



Рисунок 7. Поздние эмбриональные летали *Drosophila melanogaster*



Рисунок 8. Оболочки яиц *Drosophila melanogaster*



Рисунок 9. Ранние эмбриональные летали *Drosophila melanogaster*